

# Исследование в области полисахаридов\*

*Н. К. Кочетков*

Этот цикл исследований выполнен в лаборатории, созданной и руководимой автором в период 1962–1986 гг. Он охватывает разработку фундаментальных научных проблем в области химии углеводов, являющихся, наряду с белками и нуклеиновыми кислотами, важнейшим классом природных биополимеров и самым распространенным органическим веществом биосферы.

Углеводы являются важнейшими компонентами живой клетки, обеспечивающими ее нормальную жизнедеятельность и специфичность контактов с внешней средой. Общеизвестно их огромное техническое значение как дешевого самовоспроизводящегося сырья.

В настоящее время наблюдается огромный и быстро нарастающий интерес к этой области и стремительное развитие фундаментальных основ новой, современной химии углеводов, соответствующей современному уровню развития органической химии. Это потребовало решения таких коренных проблем, как поиски новых эффективных путей химического синтеза этих сложных соединений (особенно полисахаридов и их фрагментов) и создание новых путей, фактически новой стратегии, исследования строения сложных природных соединений этого класса с привлечением современных физико-химических методов. Эти фундаментальные разработки должны открыть путь к быстрому и эффективному изучению и синтезу новых биологически и технически важных природных веществ этого класса.

Представленный цикл работ является неотъемлемой частью исследований по указанным коренным направлениям химии углеводов, выполненных за последние два десятилетия во всем мире, а ряд наиболее значительных исследований этого цикла был выполнен впервые в мировой практике и знаменует приоритет нашей науки.

## **1. Разработка новых эффективных методов установления строения полисахаридов**

Установление строения полисахаридов сложной структуры химическими методами — весьма трудоемкий процесс. Классические

химические методы основаны на расщеплении молекулы биополимера на небольшие фрагменты, анализе их структуры и, на основании этих данных, воссоздании структуры исходного полимера. В последние 10–20 лет все большее значение в этой области получили физико-химические методы, которые позволяют значительно быстрее и экономичнее получать данные о строении полисахаридов или их фрагментов.

Нашими работами внесен значительный вклад в развитие новых путей установления строения полисахаридов.

### *Методы избирательного расщепления полисахаридной цепи*

Метод воссоздания структуры полимера по его фрагментам наиболее эффективен в том случае, когда расщепление полисахарида на фрагменты протекает по определенным моносахаридным звеньям. Нами были разработаны два таких метода: методы избирательного расщепления по звеньям уроновых кислот и по звеньям аминасахаров.

Первый из них основан на превращении уроновой кислоты в соответствующий амид и последующей гофмановской перегруппировке, приводящей к разрыву гликозидной связи этого звена и фрагментации полимера (схема 1). Второй метод основан на дезаминировании

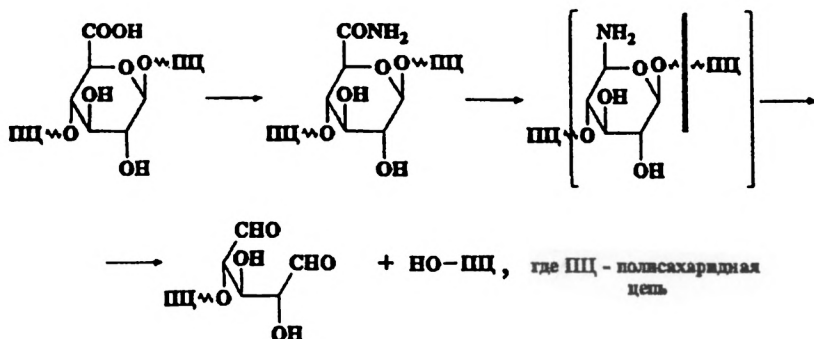


Схема 1

аминосахара под действием азотистой кислоты, что приводит к сокращению цикла в процессе демьяновской перегруппировки с разрывом гликозидной связи и специфическим распадом полимерной цепи (схема 2).

Оба метода были использованы в нашей работе при установлении строения природных полисахаридов, а метод дезаминирования прочно вошел в мировую практику.

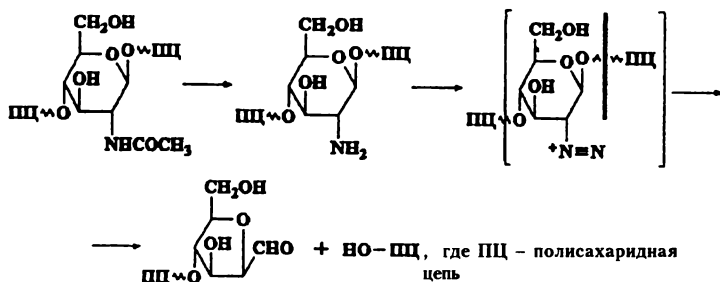


Схема 2

### Физико-химические методы

Из-за особенностей структуры углеводов лишь два физико-химических метода оказались достаточно информативными и универсальными при работе с углеводами — масс-спектрометрия и ЯМР-спектроскопия.

**Масс-спектрометрический анализ**, требующий очень малого количества вещества и дающий точные данные о структуре молекулы, был впервые использован для установления строения углеводов в нашей работе. В результате систематического исследования масс-спектров моносахаридов различных классов нами были установлены основные пути фрагментации моносахарида под действием электронного удара, определены наиболее диагностические ионы (схема 3) и разработаны принципы установления строения производных моносахаридов по структуре осколочных ионов, образующихся при фрагментации.

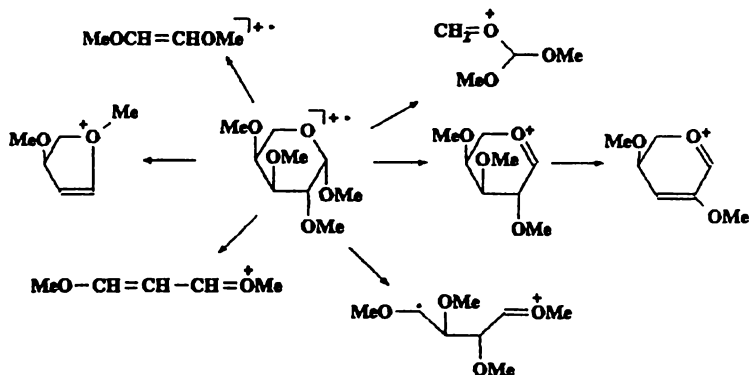


Схема 3

Далее были изучены принципы фрагментации олигосахаридов; при этом была обнаружена фундаментальная закономерность — последовательное отщепление моносахаридных единиц от олигомерной цепи и дальнейшая их независимая фрагментация. Это создало возможность использовать масс-спектрометрию для решения самой трудной задачи структурного анализа полисахаридов — определения последовательности моносахаридов в цепи биополимера.

Этими исследованиями были созданы теоретические и методические основы использования масс-спектрометрического анализа моно- и олигосахаридов, и метод стал одним из основных повседневных методов изучения углеводов и широко используется во всем мире.

**Развитие  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии для анализа структуры полисахаридов и его компьютеризации** является одним из последних важных достижений в структурной химии углеводов.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопия, благодаря широте шкалы химсдвигов и поэтому высокой разрешающей способности, оказалась особенно удобной для установления строения полисахаридов непосредственно на уровне полимера. Нами было систематически изучено большое число  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектров модельных олигосахаридов и природных полисахаридов в сочетании с теоретическими расчетами их конформации. Это позволило точно определить так называемые эффекты гликозилирования (т. е. отличия в химсдвигах соответствующих С-атомов в моносахариде и в полимере), что, в свою очередь, позволило теоретически рассчитать сложные спектры полисахаридов и, главное, решить обратную задачу — по экспериментальному спектру установить строение сложной молекулы полисахарида посредством перебора очень большого количества теоретически мыслимых структур для данного моносахаридного состава. Практически эта задача была решена в использовании ЭВМ, для чего была составлена программа, включающая: а) генерацию всех возможных структур полисахаридов данного состава; б) вычисление  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектра для каждой структуры и в) сравнение экспериментального спектра с вычисленным и нахождение спектра с наименьшим отклонением от экспериментального. Созданный метод после проверки на полисахаридах известной структуры был применен для установления строения полисахаридов неизвестной структуры, дал очень хорошие результаты для полисахаридов линейной структуры и в настоящее время начинает широко использоваться в повседневной работе.

Это первое в мире реальное использование ЭВМ для установления строения сложных полисахаридов позволяет в сотни раз сократить

время, затрачиваемое на решение той же задачи классическими химическими методами.

## **2. Структура бактериальных полисахаридов**

При использовании разработанных нами подходов и методов были проведены широкие исследования строения представителей двух важных классов углеводсодержащих биополимеров — бактериальных полисахаридов и гликопротеинов.

**Изучение структуры бактериальных полисахаридов** дает важные сведения, необходимые для выяснения зависимости биологической специфичности от строения, закладывает прочные основы для классификации бактерий на молекулярном уровне, позволяет выяснить некоторые генетические связи в мире микроорганизмов, а в практическом плане дает сведения, необходимые для создания диагностических и лечебных сывороток.

Основываясь на приведенных выше разработках, была изучена структура О-антигенных полисахаридов двух групп патогенных бактерий — Шигелла дизентерия, одного из возбудителей дизентерии, и Псевдомонас аэругиноза, возбудителя гнойно-септических послеожоговых и раневых инфекций. С использованием химических и физико-химических методов была установлена структура полисахаридов всех 10 серотипов Ш. дизентерия, которые оказались гексозаминогликанами сложной структуры, построенными из регулярно повторяющихся олигосахаридных звеньев (табл. 1). Сравнительный анализ установленных структур позволил объяснить известные особенности этой группы бактерий — отсутствие внутригрупповых серологических связей и наличие родственных связей с бактериями других групп, устойчивость бактерий к фагоцитозу, термоллабильность их антигенов и т. д. Был установлен также знаменательный факт полной химической идентичности структуры О-антигенов двух серотипов Шигелла и двух серотипов другой группы бактерий Эширихия коли, которые известны идентичностью своих серологических реакций. Это первое экспериментальное свидетельство того, что независимо от микробиологической принадлежности только химическая структура углеводного биополимера полностью определяет его серологическую специфичность.

Далее были изучены полисахариды 31 серотипа П. аэругиноза. Все полисахариды оказались также очень сложными по строению гексозаминогликанами. Сравнение этих структур позволило создать точную, основанную на химическом строении, классификацию антигенов П. аэругиноза, что вносит полную ясность в запутанную картину внутригрупповых связей этой обширной группы бактерий.

Таблица 1

Структура О-антигенных полисахаридов бактерии  
*Shigella dysenteriae*

Серотип	Повторяющееся звено
1	$-2)-\text{Gal}-(1^{\alpha}_3)-\text{GlcNAc}-(1^{\alpha}_3)-\text{Rha}-(1^{\alpha}_3)-\text{Rha}-(1^{\alpha}_2$
2	$-4)-\text{GalNAc}-(1^{\alpha}_4)-\text{Glc}-(1^{\alpha}_4)-\text{Gal}-(1^{\beta}_3)-\text{GalNAc}-(1^{\alpha}_2$ $\alpha \begin{array}{c} 3 \\   \\ 1 \end{array}$ $3(4)\text{AcOGlc}$
3	$\text{GlcLA}-(1^{\beta}_6)-\text{Glc}$ $\alpha \begin{array}{c} 1 \\   \\ 4 \end{array}$ $-3)-\text{GalNAc}-(1^{\beta}_3)-\text{Gal}-(1^{\alpha}_6)-\text{Gal}-(1^{\beta}_2$
4	$-3)-\text{GlcNAc}-(1^{\alpha}_4)-\text{GlcA}-(1^{\alpha}_3)-\text{Fuc}-(1^{\alpha}_3)-\text{GlcNAc}-(1^{\alpha}_2$ $\alpha \begin{array}{c} 4 \\   \\ 1 \end{array}$ $\text{AcOFuc}$
5	$-4)-\text{Man}-(1^{\alpha}_4)-\text{Man}-(1-3)-\text{GlcNAc}-(1^{\beta}_2$ $\alpha \begin{array}{c} 3 \\   \\ 1 \end{array}$ $\text{RhaLA}$ $\begin{array}{c} 2 \\   \\ 1 \\ \text{OAc} \end{array}$
6	$-3)-\text{GalNAc}-(1^{\beta}_3)-\text{Gal}-(1^{\alpha}_6)-\text{Glc}-(1^{\alpha}_2$ $\begin{array}{c} 4 \\   \\ 1 \\ \text{Sug} \end{array}$
7	$-4)-\text{GalNAcA}-(1^{\alpha}_4)-\text{GalNAcA}-(1^{\alpha}_3)-\text{GalNAcA}-(1^{\alpha}_3)-\text{Qu14N}-(1^{\beta}_2$ $\begin{array}{c} 3 \\   \\ \text{OAc} \end{array}$ $\begin{array}{c} 4 \\   \\ \text{GlyAc} \end{array}$
8	$\text{GlcNAc}-(1^{\beta}_4)-\text{Glc}$ $\beta \begin{array}{c} 1 \\   \\ 4 \end{array}$ $-3)-\text{GalNAc}-(1^{\beta}_4)-\text{GlcA}-(1^{\beta}_3)-\text{GalNAc}-(1^{\beta}_2$
9	$-3)-\text{Gal}-(1^{\beta}_4)-\text{Man}-(1^{\beta}_4)-\text{Gal}-(1^{\alpha}_3)-\text{GlcNAc}-(1^{\beta}_2$ $\begin{array}{c} 4 \quad 6 \\ \text{CH}_3\text{CCO}_2\text{H} \end{array}$ $\begin{array}{c} 2 \\   \\ \text{OAc} \end{array}$
10	$-3)-\text{ManNAc}-(1^{\alpha}_3)-\text{Rha}-(1^{\beta}_4)-\text{GlcNAc}-(1^{\alpha}_2)-\text{Man}-(1^{\beta}_2$

Характерной и весьма интересной особенностью изученных полисахаридов явилось наличие в их составе большого количества

(около 20) новых моносахаридов, для которых была установлена структура. Среди них было найдено два совершенно новых типа кислых моносахаридов, названных нами гликолактиловыми и псевдаминовыми кислотами, что значительно обогащает химию углеводов.

### 3. Исследования по синтетической химии углеводов

Развитие новых методов синтеза олигосахаридов и полисахаридов, помимо очень большого принципиального и методического значения для развития органической химии в целом, важно для получения малодоступных или вовсе недоступных веществ и соответствующих модельных соединений для физико-химических и биологических исследований. На основе разработанных методов создаются и практически важные вещества, например, искусственные антигены для диагностики заболеваний.

В представленный цикл исследований включена разработка новых стереоспецифических методов создания гликозидной связи (методы гликозилирования), общих принципов синтеза олигосахаридов, обладающих специфической биологической активностью, синтез искусственных антигенов нового типа и разработка первого общего метода синтеза полисахаридов.

#### *Новые методы стереоспецифического синтеза гликозидной связи*

Гликозидная связь является единственным типом межмономерной связи всех полимерных углеводов, поэтому разработка новых методов ее создания является центральной задачей на путях синтеза сложных углеводов. Существовавшие к моменту начала этих исследований методы отличались низкой стереоспецифичностью и не позволяли решать важнейшие задачи, в частности, осуществление синтеза полисахаридов регулярного типа. Нами разработаны принципиально новые методы создания 1,2-транс-гликозидной связи, отличающиеся высокой стереоспецифичностью. Они основаны на использовании в качестве гликозилирующего реагента бициклических производных типа I, которые, отщепляя экзоциклическую функциональную группу, в условиях электрофильного катализа, образуют бициклический интермедиат диоксолиенивого типа II; последний может подвергаться нуклеофильной атаке только с одной стороны, обеспечивая стереоспецифическое образование 1,2-транс-(или 1,2-цис)-гликозидной связи.

На этой основе разработаны три новых метода синтеза гликозидной связи: 1) ортоэфирный метод — гликозилирование 1,2-ортоэфирами сахаров ( $1.X = OAlk$ ) в присутствии кислого катализатора (образование 1,2-транс-гликозидной связи); 2) цианэтилиденная

конденсация — конденсация 1,2-цианэтилиденовых производных сахаров (1,  $X = CN$ ) с О-третиловым эфиром гидроксилсодержащей компоненты в присутствии перхлората третилия (также 1,2-транс-гликозидная связь) и 3) гликозилирование тиоцианатами сахаров (1.  $X = SA1k$  или  $SAr$ ) О-третиловых эфиров гидроксилсодержащей компоненты в присутствии перхлората третилия (образование 1,2-дис-гликозидной связи).

Первый из этих методов, разработанный 20 лет назад, прочно вошел в синтетическую практику советских и зарубежных лабораторий. Второй метод — «цианэтилиденная конденсация» получил особо важное значение, так как на его основе удалось впервые в мире разработать синтетические пути к полисахаридам регулярного типа.

Эти фундаментальные разработки оказались очень важным звеном при решении одной из самых коренных и трудных проблем синтетической химии сахаров — повышении стереоспецифичности реакции гликозилирования.

#### *Синтез олигосахаридов и искусственные антигены нового типа*

Синтез олигосахаридов — фрагментов со специфической биологической активностью является важным звеном на пути синтеза искусственных антигенов и природных полисахаридов. На примере синтеза фрагментов специфических бактериальных полисахаридов нами были определены основные принципы такого синтеза (выбор метода гликозилирования, рациональный подбор защитных групп, общая стратегия наиболее целесообразной сборки молекулы олигосахарида и т. д.).

Впервые в мировой практике осуществлен синтез сложных по структуре фрагментов — антигенов бактерий, а именно бактерий, вызывающих желудочно-кишечные заболевания, — группа Сальмонелла. Далее был выполнен синтез более сложных олигосахаридов, состоящих из двух и трех повторяющихся звеньев полисахарида С. ньюингтонгексасахарида и нонасахарида соответственно.

На основе этих разработок были созданы искусственные безбелковые антигены принципиально нового типа. Существовавший до этого метод получения антигенов состоял в пришивке олигосахаридного фрагмента (детерминанта биологической специфичности) к белку.

Новый принцип основан на получении макромолекулы антигена радикальной сополимеризацией олигосахаридного фрагмента, несущего аллильную группировку, с акриламидом (схема 4). Полученные препараты, в которых можно было регулировать содержание олиго-



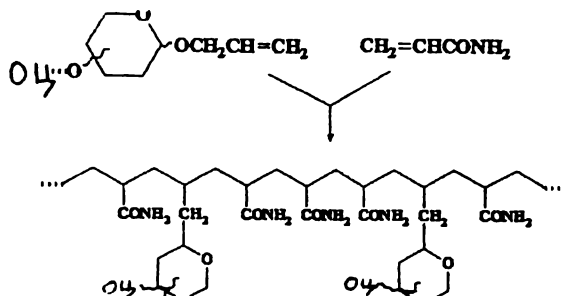


Схема 4

сахаридных детерминант и липофильность, были лишены недостатков антигенов, созданных на основе белка, и были более доступными и пригодными для точной диагностики бактериальных инфекций, обладая достаточно высокой иммуногенностью.

Этим методом были приготовлены искусственные антигены со специфичностью бактерий группы Сальмонеллы (подгруппы В, Д и Е) и Стрептококкус пневмония серогруппы 3.

### *Синтез полисахаридов регулярного строения*

Реальных подходов к созданию достаточно общего метода синтеза полисахаридов до нашего исследования не существовало. Разработка широкого по своим возможностям синтеза полисахаридов регулярного типа, в том числе природных гетерополисахаридов с высокой биологической специфичностью, является важным достижением синтетической органической химии, сравнимым с первыми химическими синтезами белка и нуклеиновых кислот. Метод был разработан на основе открытой и разработанной нами цианэтилиденовой конденсации, что позволило обойти главную принципиальную трудность, встречающуюся на пути получения этих биополимеров, — нарушение стереоспецифичности при образовании полисахаридной цепи. При поликонденсации производных углеводов, содержащих в одной молекуле цианэтилиденовую группировку и О-триметилную группу, в условиях цианэтилиденовой реакции образуется регио- и стереорегулярная полисахаридная цепь, в которой звенья соединены 1,2-тринс-гликозидной связью («цианэтилиденная поликонденсация»). Если «мономером» является производное моносахарида, образуется регулярный гомополисахарид, в случае производного олигосахарида — регулярный гетерополисахарид, состоящий из повторяющихся оли-

госахаридных звеньев, связанных 1,2-транс-гликозидной связью. В большинстве случаев реакция идет с полной стереоспецифичностью возникающих гликозидных связей. В тех случаях, когда она частично нарушается в обычных условиях, проведение реакции под высоким давлением (до 14 килобар) позволяет получить полисахарид также с абсолютной стереоспецифичностью.

Этим методом нами, впервые в мировой практике, было получено значительное число регулярных синтетических гомо- и гетерополисахаридов.

Наиболее уникальным достижением является синтез сложных природных гетерополисахаридов бактерий, а именно О-антигенных полисахаридов Сальмонеллы ньюингтон, Шигелла флекснери (см., например, схему 5) и капсульного полисахарида Стрептококкус пневмония.

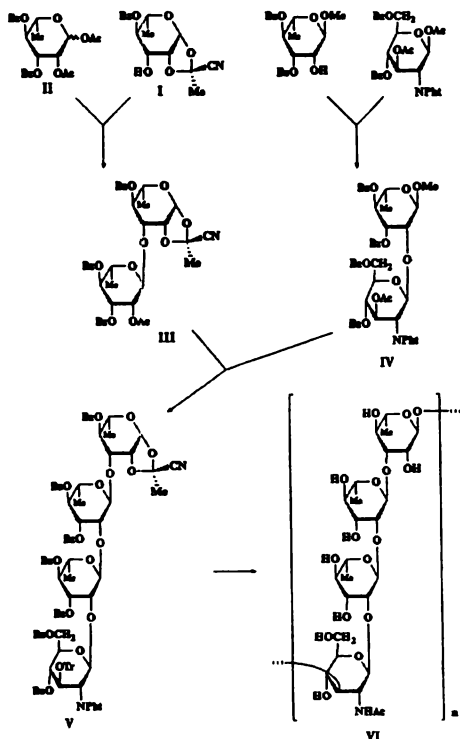


Схема 5

В этих синтезах особенно трудным было получение сложных по структуре и точно функционализированных олигосахаридных «мономеров», для чего была разработана эффективная стратегия сборки молекулы, использовавшая наш опыт олигосахаридного синтеза.

Синтезы природных бактериальных полисахаридов являются одним из высших достижений современной синтетической химии углеводов.

\* \* \*

Проведенное исследование вносит фундаментальный вклад в развитие химии углеводов. Наиболее существенные результаты были получены впервые в мировой практике и инициировали развитие соответствующих научных направлений. Сюда относятся, прежде всего, первый общий метод синтеза полисахаридов и разработка связанных с этим принципиально новых путей стереоспецифического синтеза гликозидной связи; разработка основ масс-спектрометрического анализа структуры углеводов и внедрение его в повседневную исследовательскую практику; разработка теоретических основ  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии полисахаридов и создание на этой основе компьютеризованного метода установления строения полисахаридов регулярного строения; разработка подходов к синтезу биологически важных олигосахаридов и создание на этой основе искусственных антигенов нового типа.

---

\* Краткое содержание лекции, прочитанной лауреатом Демидовской премии за 1993 г.